

ZAŁĄCZNIK Nr 2

dr Magdalena Arasimowicz-Jelonek

**Autoreferat przedstawiający opis dorobku
i osiągnięć naukowych**

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Wydział Biologii

Zakład Ekofizjologii Roślin

Poznań 2013

1. Imię i nazwisko:

Magdalena Arasimowicz-Jelonek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

Dyplom doktora nauk rolniczych w zakresie ogrodnictwa

2006 rok, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Ogrodniczy, Katedra Fizjologii Roślin

Temat pracy doktorskiej: „Udział tlenu azotu w reakcji obronnej liści pelargonii bluszczolistnej (*Pelargonium peltatum* L.) na *Botrytis cinerea* Pers.”

Promotor: prof. dr hab. Jolanta Floryszak-Wieczorek

Dyplom magistra inżyniera w zakresie leśnictwa

2002 rok, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Leśny, Katedra Botaniki Leśnej

Temat pracy magisterskiej: „Właściwości lecznicze rodzaju *Rubus* L.”

Promotor: dr hab. inż. Władysław Danielewicz

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

01.10.2007 – obecnie – adiunkt, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Zakład Ekofizjologii Roślin

01.10.2006 – 30.09.2007 – wykonawca projektu KBN Nr 2PO6A 016 27, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Ogrodniczy, Katedra Fizjologii Roślin

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Udział tlenu azotu w reakcji roślin na stresy środowiskowe

b) Publikacje wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego

1. **Arasimowicz M. (40%)**, Floryszak-Wieczorek J., Milczarek G., Jelonek T. 2009. Nitric oxide induced by wounding mediates redox regulation in pelargonium leaves. *Plant Biology*, 11, 650-663. (IF: 2.32; 35 pkt. MNiSW)
2. **Arasimowicz M. (50%)**, Floryszak-Wieczorek J., Kubiś J. 2009. Interaction between polyamine and nitric oxide signaling in adaptive responses to drought in cucumber. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 177–186. (IF: 1,990; 35 pkt. MNiSW)
3. **Arasimowicz-Jelonek M. (50%)**, Floryszak-Wieczorek J., Kubiś J. 2009. Involvement of nitric oxide in water stress-induced responses of cucumber roots. *Plant Science*, 177, 682-690. (IF: 2.922; 30 pkt. MNiSW)
4. **Arasimowicz-Jelonek M. (70%)**, Floryszak-Wieczorek J. 2011. Understanding the fate of peroxyxynitrite in plant cells - from physiology to pathophysiology. *Phytochemistry* 72, 681-688. (IF: 3.050; 40 pkt. MNiSW)
5. **Arasimowicz-Jelonek M. (60%)**, Floryszak-Wieczorek J., Gwóźdź E.A. 2011: The message of nitric oxide in cadmium challenged plants. *Plant Science*, 181, 612-620. (IF: 2.922; 30 pkt. MNiSW)
6. **Arasimowicz-Jelonek M. (40%)**, Floryszak-Wieczorek J., Deckert J., Rucińska-Sobkowiak R., Gzyl J., Pawlak-Sprada S., Abramowski D., Jelonek T., Gwóźdź E.A. 2012. Nitric oxide implication in cadmium induced programmed cell death in roots and signaling response of yellow lupine plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58, 124-134. (IF: 2.755; 35 pkt. MNiSW)

7. **Arasimowicz-Jelonek M. (60%)**, Floryszak-Wieczorek J., Drzewiecka K., Chmielowska-Bąk J., Abramowski D., Izbiańska K. 2013. Aluminum induces cross-resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Planta*, DOI: 10.1007/s00425-013-2008-8 (IF: **3,347**; 40 pkt. MNiSW)
8. **Arasimowicz-Jelonek M. (90%)**, Floryszak-Wieczorek J. 2013. Nitric oxide: an effective weapon of the plant or the pathogen? *Molecular Plant Pathology*, DOI: 10.1111/mpp.12095 (IF: **3,877**; 40 pkt. MNiSW)

c) Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę o ubieganie się o stopień doktora habilitowanego stanowi osiem prac opublikowanych w latach 2009-2013, w których wykazano **udział tlenu azotu w reakcji roślin na stresy środowiskowe**. Sumaryczny Impact Factor tych pozycji wynosi **23,18** a sumaryczna liczba punktów MNiSW to **285**. We wszystkich ośmiu publikacjach jestem autorem pierwszym, w tym w siedmiu również autorem korespondencyjnym.

Badania ostatnich 15 lat wykazały, że tlenek azotu (NO) to prosta molekula do "zadań specjalnych", działająca na wielu polach metabolicznych rośliny. Jak udokumentowano, NO steruje wzrostem i rozwojem rośliny, począwszy od kiełkowania, a skończywszy na kwitnieniu, dojrzewaniu owoców i starzeniu się jej organów. Również w warunkach zagrożenia stresogennymi czynnikami środowiska, tak o charakterze biotycznym, jak i abiotycznym, dochodzi do wzmożonego generowania tlenu azotu w różnych organach rośliny.

Badania nad poznaniem roli NO w układzie roślina-patogen grzybowy, zostały przeze mnie zainicjowane w 2002 roku w ramach realizowanej pracy doktorskiej, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Floryszak-Wieczorek. Niewątpliwie, podjęta wówczas tematyka badawcza należała do nowatorskich, nie tylko w skali naszego kraju, gdyż pierwsze prace na temat kluczowej roli NO w mechanizmach obronnych rośliny względem patogenów ukazały się zaledwie cztery lata wcześniej, tj. w 1998 roku (Delledonne i in. 1998; Durner i in. 1998). Podsumowaniem czterech lat badań wykonywanych w Katedrze Fizjologii Roślin

obecnego Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu była obroniona przeze mnie praca doktorska nt. „Udział tlenu azotu w reakcji obronnej liści pelargonii bluszczolistnej (*Pelargonium peltatum* L.) na *Botrytis cinerea* Pers”. Spośród uzyskanych wyników dowiedziono m.in., że w miejscu infekcji patogen indukował wczesny i miejscowy wybuch NO (typu NO „hot spots”), który przy współdziałaniu endogennych regulatorów tj. kwasu salicylowego (SA) i etyleny stymulował różną odpowiedź obronną rośliny. W genotypie odpornym prowadziły one do nadwrażliwej śmierci (typu HR) komórki zaatakowanej, z kolei w genotypie podatnym do nekrozy i rozwoju choroby liści pelargonii (Floryszak-Wieczorek i in. 2007). Praca realizowana częściowo w ramach grantu KBN, została opublikowana i znalazła się na 2. miejscu, spośród 10. prac z dziedziny biologii eksperymentalnej roślin wydanych w latach 2007-2008, a wyróżnionych przez Kapitułę Nagrody Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin.

W tym miejscu należy nadmienić, iż synteza i potencjalna funkcja NO w trakcie interakcji roślina-patogen były analizowane jak dotąd wyłącznie z punktu widzenia roślino-gospodarza. Tymczasem interakcja roślina – patogen stanowi układ bardzo dynamiczny. W swojej najnowszej pracy przeglądowej „*Nitric oxide: an effective weapon of the plant or the pathogen?*” udokumentowałam, iż synteza NO może stanowić jedną z licznych strategii inwazyjnych jakie patogeny zdołały rozwinąć w toku przemian ewolucyjnych. Zgodnie z zaproponowaną przeze mnie hipotezą, to patogeniczne mikroorganizmy ewolucyjnie wykorzystywały jako pierwsze NO jako skuteczną broń agresora, dzięki której zdołały opanować organizm rośliny-gospodarza (Arasimowicz-Jelonek i Floryszak-Wieczorek 2013)

Zważywszy na fakt, że endogenne NO występuje w organizmach żywych w bardzo niskich stężeniach, brakowało czułych i wiarygodnych metod detekcji tej molekuly. Stąd też postęp jaki się dokonał w kwestii wyjaśnienia roli endogennego NO w roślinie, możliwy był zazwyczaj dzięki zastosowaniu różnych donorów NO. Jednak stosowanie egzogenne NO w roślinie, w różnych postaciach i dawkach, nie podlegało szczególnie krytycznej ocenie. Inaczej rzecz ujmując, nie każde indukowane przez donory NO odpowiedzi metaboliczne są wiarygodne i powtarzalne w innych układach doświadczalnych, dlatego też badania, w których uczestniczyłam miały na celu wyjaśnienie problemu związanego z powszechnym wówczas traktowaniem roślin donorami NO, jako funkcjonalnymi substytutami endogennego tlenu azotu. Uzyskane wyniki dowiodły zróżnicowaną w czasie kinetykę i tym samym ilość

uwalnianego NO z najczęściej stosowanych w biologii eksperymentalnej roślin donorów, tj. nitroprusydek sodu (SNP), S-nitrozoglutation (GSNO) oraz S-nitrozo-*N*-acetyl-D-penicylamina (SNAP) (Floryszak-Wieczorek i in. 2006). W eksperymentach przeprowadzonych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* udowodniliśmy, że okres półtrwania donora jest stosunkowo krótki, a ponadto emisja NO z donora zależy od wielu czynników, takich jak dostępność czynnika redukującego (GSH, askorbinian), bądź światła (Floryszak-Wieczorek i in. 2006). Opublikowane wyniki spotkały się z bardzo przychylnym przyjęciem światowych ekspertów w badaniach nad NO, którzy osobiście podzielili się z nami podobnymi obawami i zastrzeżeniami, co do niebezpieczeństwa bezkrytycznego stosowania egzogennych donorów NO. Wspomniana publikacja otrzymała również wyróżnienie w konkursie o nagrodę Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin w latach 2005-2007.

W toku dalszych dociekań nad zastosowaniem podejścia farmakologicznego jako wartościowego, chociaż trudnego w interpretacji, narzędzia do badania funkcjonalnej roli NO w metabolizmie rośliny, uzyskałam wyniki wskazujące na istotne różnice jakościowe w profilu map białkowych oraz aktywności wybranych białek enzymatycznych w odpowiedzi na traktowanie różnymi donorami NO (Arasimowicz-Jelonek i in. 2011). Co istotne, badane efekty fizjologiczno-biochemiczne były ściśle skorelowane z natężeniem i czasookresem uwalniania NO z poszczególnych donorów. Weryfikacja stosowanych donorów umożliwiła mi precyzyjne zaplanowanie dalszych eksperymentów służących przede wszystkim poznaniu roli NO w mechanizmach naprawczych roślin względem różnych czynników stresogennych.

Po uzyskaniu stopnia doktora i podjęciu pracy w zespole prof. dr hab. Edwarda A. Gwoździa w Zakładzie Ekofizjologii Roślin UAM przedmiotem moich kolejnych dociekań naukowych było poznanie funkcjonalnej roli NO w reakcji rośliny na abiotyczne stresy środowiskowe. Do moich osiągnięć metodycznych z pewnością należy zaliczyć zaadoptowanie w prowadzonych przeze mnie eksperymentach szeregu metod *in situ*, o niskim stopniu inwazyjności, które umożliwiły mi detekcję endogennego NO oraz uzyskanie wyszczególnionych efektów naukowych. Do najistotniejszych stosowanych metod należy zaliczyć: selektywny mikrosensor do pomiaru endogennego NO w pojedynczej komórce roślinnej (konstruowany we współpracy z pracownikami Politechniki Poznańskiej),

wykorzystanie różnych znaczników fluorescencyjnych w mikroskopii konfokalnej oraz obrazowanie programowanej śmierci komórki metodą TUNEL w mikroskopie świetlnym.

Ze względu na fakt, że porażeniom różnych organów rośliny przez patogeny towarzyszy zazwyczaj uszkodzenie tkanki, w pierwszym etapie podjętych przeze mnie eksperymentów zbadalam udział NO w zranieniu i zabliźnianiu uszkodzeń epidermy i tkanki miękiszowej liści. Wykorzystując jako model liście pelargonii bluszczolistnej oraz posługując się dwoma nisko inwazyjnymi metodami detekcji NO, tj. selektywną mikroelektrodą oraz specyficznym fluorochromem (DAF2-DA) wykazałam okresową nadprodukcję NO, rozpoczynającą się już w pierwszych minutach po uszkodzeniu tkanki. Generowanie tej molekuly kształtowało się na relatywnie niskim poziomie i ulegało wygaszeniu po 2 godzinach (Arasimowicz i in. 2009). Co istotne, natężenie NO indukowane zranieniem było blisko 12 razy niższe w porównaniu do akumulacji NO odnotowanej przez nas wcześniej tą samą metodą detekcji, w liściach pelargonii infekowanych nekrotroficznym patogenem *Botrytis cinerea* (Floryszak-Wieczorek i in. 2007). Ponadto, wykorzystanie liści pelargonii tej samej odmiany pozwoliło nam, poprzez porównanie, na postawienie hipotezy, iż czasokres i natężenie generowania NO we wczesnym etapie po odbiorze sygnału niesie prawdopodobnie informacje o rodzaju czynnika stresogennego. Dodatkowo, w oparciu o wypracowane uprzednio podejście farmakologiczne, wykazałam, iż obserwowana krótkotrwała synteza NO odgrywa kluczową rolę w regeneracji uszkodzonej tkanki. Jak udokumentowałam eksperymentalnie, tlenek azotu hamował aktywność katalazy i peroksydazy askorbinianowej, co wpłynęło na utrzymanie wysokiego poziomu nadtlenu wodoru niezbędnego w procesie lignifikacji i akumulacji kalozy w rejonach uszkodzonego poprzez nacięcie liścia. Dodatkowo kooperacja sygnałów NO/H₂O₂ przekładała się na ograniczenie spadku puli niskocząsteczkowych antyoksydantów (tj. kwas askorbinowy oraz tiol) w odpowiedzi na zranienie. Na potwierdzenie, zastosowany zmiatacz NO (cPTIO) wyraźnie obniżał poziom H₂O₂, pulę niskocząsteczkowych antyoksydantów, a w konsekwencji osłabiał proces zabliźniania się tkanki liścia pelargonii.

Przedmiotem moich dalszych dociekań naukowych stało się poznanie roli NO w innym ważnym stresie abiotycznym, tj. stresie odwodnienia, ze szczególnym akcentem postawionym na poznanie interakcji tlenu azotu z poliaminami (Arasimowicz-Jelonek i in. 2009a). W celu zweryfikowania sekwencji czasowej uruchamianych sygnałów, tak poliamin

(PAs), jak i NO w warunkach narastającego deficytu wody, rośliny ogórka traktowano wstępnie donorem NO badając poziom endogennych poliamin i odwrotnie - podając przed stresem PAs analizowano postresowe generowanie endogennego NO. W rezultacie wykazano, że w warunkach narastającego odwodnienia to poliaminy indukują syntezę NO, która była blokowana w odpowiedzi na wolframian (inhibitor reduktazy azotanowej - NR) oraz częściowo hamowana przez podanie L-NAME (inhibitor syntazy tlenu azotu –NOS like). Istotnym zatem osiągnięciem było wykazanie, iż zależna od PAs synteza NO odbywa się z udziałem reduktazy azotanowej, a w mniejszym stopniu na drodze zależnej od L-argininy z udziałem potencjalnej syntazy tlenu azotu. Akumulowany NO wyraźnie łagodził ujemne skutki dehydratacji, co przejawiało się zwiększoną integralnością błon cytoplazmatycznych oraz obniżonym stopniem peroksydacji lipidów w liściach ogórka. Ponadto według zaproponowanego modelu interakcji PAs-NO podczas deficytu wody, NO może poprzez S-nitrozylację adenozylotransferazy metioniny (MAT), obniżyć pulę wspólnego prekursora dla syntezy PAs i etylenu tj. S-adenozylometioniny (SAM), co wskazuje na istnienie negatywnego sprzężenia pomiędzy nadprodukcją NO i poliaminami. Co więcej, obniżona synteza etylenu wraz ze sprawnym mechanizmem zamykania aparatów szparkowych, w który zaangażowany jest NO, może przekładać się na zwiększoną tolerancję na stres odwodnienia. Praca, w której zamieszczono uzyskane wyniki oraz powyższe założenia została wyróżniona przez *Journal of Plant Growth Regulation* poprzez zamieszczenie na okładce czasopisma opracowanego przez nas projektu graficznego, odsyłającego do zamieszczonego wewnątrz artykułu.

W kolejnym cyklu doświadczeń wykorzystując bio-obrazowanie z fluorochromem DAF2-DA, wykazałam generowanie NO w korzeniach ogórka w warunkach narastającego odwodnienia (Arasimowicz-Jelonek i in. 2009b). Podobnie jak w liściach tej rośliny, synteza NO w korzeniach była w znacznym stopniu zależna od aktywności NR. Dodatkowo stosując donory NO (SNP i GSNO) oraz niezależnie inhibitory syntezy endogennego tlenu azotu wykazałam wpływ tej molekuly na ograniczanie ujemnych skutków deficytu wody związanych z obniżoną aktywnością lipoksygenazy (LOX) oraz spadkiem peroksydacji lipidów. Co ciekawe, jedynie w 5 godz. trwania stresu odnotowałam okresowy wzrost aktywności LOX skorelowany ze wzrostem peroksydacji lipidów, co najprawdopodobniej mogło sprzyjać produkcji hydroksynadtlenków lipidowych będących substratem dla innego ważnego w stresie odwodnienia sygnału, tj. kwasu jasmonowego (Shimazaki i in. 2005).

Uzyskane przeze mnie wyniki badań wykazały ponadto obniżoną akumulację proliny w odpowiedzi na NO, co wskazuje na to, iż akumulacja tego osmolitu nie jest kluczowym elementem mechanizmu tolerancji ogórka na stres suszy. Za powyższym stwierdzeniem przemawia fakt, iż silnej nadprodukcji endogennego NO podczas przedłużającego się deficytu wody, skorelowanej z symptomami stresu nitrozatywnego i oksydacyjnego, towarzyszy znaczny wzrost poziomu proliny. Uzyskane dane skłaniają zatem do wnioskowania, iż wzmożona akumulacja proliny w stresie może być indykatorem natężenia stresu (Lutts i in. 1999).

W warunkach przedłużającego się stresu lub przy zaburzonym mechanizmie wyciszania sygnału zaindukowanego przez czynniki stresowe dochodzi do nadprodukcji tlenu azotu, co może prowadzić do pojawienia się innych reaktywnych form azotu, a w konsekwencji do stresu nitrozatywnego. W świetle współczesnych badań z zakresu medycyny, szczególne znaczenie w tej kwestii przypisywane jest nadtlenoazotynowi (ONOO^-), który powstaje w wyniku gwałtownej reakcji pomiędzy NO i anionorodnikiem ponadtlenkowym (O_2^-). W świecie zwierząt ONOO^- reagując z grupami tiolowymi białek oraz wielonienasyconymi resztami kwasów tłuszczowych w lipidach, powoduje poważne uszkodzenia struktur komórkowych, a także stanowi niezbędny czynnik indukujący apoptozę. W nawiązaniu do świata roślin wyższych, wiedza dotycząca metabolizmu NO oraz jego pochodnych, pozostaje bardzo fragmentaryczna. Wykorzystując jako model badawczy korzenie 3-dniowych siewek łubinu dowiodłam produkcję tej reaktywnej formy azotu (RFA) w odpowiedzi na stres kadmu (Arasimowicz-Jelonek i in. 2011). Stosując niezależnie zmiatacze endogennego NO oraz ONOO^- zlokalizowałam formowanie tej RFA zarówno w strefie różnicowania, jak i elongacji korzeni łubinu. Równolegle prowadzone prace w innych ośrodkach naukowych wykazały obecność *in vivo* ONOO^- w zaledwie w kilku układach eksperymentalnych (Alamillo i Garcia-Olmedo 2001; Saito i in. 2006; Corpas i in. 2009). Co ciekawe, pionierskie doświadczenia wykonane przez zespół Delledonne i in. (2001) dostarczyły dowodów, iż w przeciwieństwie do komórek zwierzęcych, ONOO^- nie jest toksyczny dla komórek roślinnych. Jak się okazało, w badanym przeze mnie układzie eksperymentalnym, egzogenne ONOO^- nie wpłynęła na żywotność komórek korzeni łubinu, a co więcej zwiększona pula tej RFA sprzyjała żywotności komórek podczas stresu kadmowego (Arasimowicz-Jelonek i in. 2012). Biorąc pod uwagę założenia jakie zawarłam w pracy przeglądowej *Understanding the fate of peroxynitrite in plant cells - from physiology to*

pathophysiology, która została opublikowana w prestiżowym dziale *Phytochemistry - Molecules of Interest*, należy przypuszczać, że formowanie ONOO⁻ może prowadzić do wyciszania nadprodukowanego NO, a ten jako nieodłączny element metabolizmu komórkowego roślin, podlega sprawnej detoksykacji. Ponadto, nie wyklucza to możliwości, iż nadtlenoazotyn poprzez nitrowanie białek może potencjalnie pełnić ważne funkcje sygnałowe (Arasimowicz-Jelonek i Floryszak-Wieczorek 2011).

Duża rozbieżność i brak spójności w opublikowanych danych na temat udziału NO w stresie wywołanym przez kadm skłoniły mnie do podjęcia badań w tym zakresie tematycznym. W opublikowanej pracy przeglądowej - na specjalne zaproszenie w *Plant Science* (Arasimowicz-Jelonek i in. 2011) wykazałam w oparciu o dostępne dane literaturowe, dualizm oddziaływania tlenu azotu na roślinę w stresie kadmowym. Stworzona koncepcja poparta licznymi przykładami empirycznymi zakłada, że NO przy silnym i długotrwałym stresie wywołanym przez Cd pogłębia negatywne skutki wywołane tym metalem ciężkim, głównie poprzez S-nitrozylację fitochelatyn i konkurencyjne hamowanie transporterów żelaza. Z drugiej strony jednak przy niskich stężeniach kadmu, tlenek azotu wspomaga zdarzenia metaboliczne prowadzące do zwiększonej tolerancji rośliny względem Cd, m.in. poprzez oddziaływanie NO na sieć innych sygnałów wewnątrzkomórkowych, zmiatanie reaktywnych form tlenu oraz poprzez indukcję aktywnego zamierania komórek.

Koncepcja Overmyer i in (2003) zakłada, że aktywne zamieranie komórki jest niezbędne dla zwiększenia skuteczności działań obronnych sąsiadujących komórek lub w celu wygenerowania sygnału dystalnego, stąd też kolejne podjęte przeze mnie eksperymenty służyły weryfikacji tej hipotezy w kontekście poznania roli NO w łagodnym stresie rośliny wywołanym przez kadm (Arasimowicz-Jelonek i in. 2012). W pierwszym etapie badań dociekano czy że mechanizmy tolerancji na kadm mogą obejmować m.in. indukcję poprzez NO programowanej śmierci komórki (PCD), która z kolei może być zaangażowana w generowanie mobilnego sygnału obronnego w korzeniach 3-dniowych siewek łubinu. Bio-obrazowanie NO wykazało wczesne generowanie badanego sygnału, zlokalizowane głównie w apoplacie komórek strefy elongacyjnej korzenia. Synteza NO wyraźnie poprzedzała PCD komórek korzeni łubinu. Stosując detekcję *in situ* jąder apoptotycznych wykonaną techniką TUNEL AP w mikroskopie świetlnym zaobserwowałam, iż efekt jest zależny od stężenia kadmu i jedynie niższe dawki stymulują aktywne zamieranie komórek. Ponadto zastosowanie

zmiaacza endogennego NO wyraźnie ograniczało liczbę komórek zamierających aktywnie pod wpływem kadmu. Podobny efekt uzyskałam stosując inhibitor oksydazy NADPH, odpowiedzialnej za produkcję O_2^- w stresie kadmowym. Interpretując uzyskane przez mnie wyniki badań można przyjąć, iż kooperacja pomiędzy NO i O_2^- jest niezbędna aby wprowadzić komórki korzeni łubinu na drogę PCD. Z kolei w celu stwierdzenia, czy PCD indukowana kadmem może być zaangażowana w generowanie sygnału dystalnego wykorzystałam 12-dniowe siewki łubinu w fazie dwóch w pełni rozwiniętych liści. Stosując technikę TUNEL fluorescein stwierdziłam, iż komórki korzeni łubinu siewek 12-dniowych zamierają aktywnie począwszy od 24h po zastosowaniu stresu kadmowego, a obserwowanym zmianom w korzeniach roślin towarzyszy wzmożone generowanie reaktywnych form azotu oraz tlenu. Ponadto, obserwowane w wierzchołkach korzeni symptomy PCD były skorelowane w czasie z generowaniem NO w wyższych strefach korzeni oraz w liściach siewek. Wizualizacja NO w liściach łubinu pozwoliła dodatkowo zlokalizować NO w wiązках floemu i komórkach bezpośrednio z nimi sąsiadujących. Istnieje zatem prawdopodobieństwo, iż NO może funkcjonować jako mobilny sygnał dystalny np. w postaci S-nitrozoglutationu (GSNO). Powyższe zmiany zanotowane w odpowiedzi na kadm były skorelowane w czasie ze wzmożoną akumulacją w liściach innego ważnego sygnału tj. kwasu salicylowego (SA).

Zdarza się, iż w efekcie nabywania odporności na jeden stres, roślina może zwiększyć odporność na pozostałe. Zjawisko to nosi nazwę tolerancji krzyżowej lub odporności krzyżowej. Tak, więc przejście umiarkowanego stresu abiotycznego może powodować wzrost odporności rośliny na stres biotyczny i odwrotnie. Oparta na pionierskich pracach Chester'a (1933), hipoteza postawiona przez Walters'a (2009) zakłada, że rośliny rosnące w warunkach naturalnych lub polowych, narażone na ustawiczne oddziaływanie różnych stresowych czynników środowiska, mogą podlegać selektywnej immunizacji. Ponadto metale obecne w środowisku mogą w różny sposób chronić rośliny przed stresem biotycznym, m.in. poprzez aktywację tych samych szlaków przekazu sygnału oraz syntezę i akumulację metabolitów obronnych (Poschenrieder i in. 2006). Chcąc zatem wyjaśnić czy i w jakim stopniu NO może być mediatorem uruchamianego systemicznie stanu wzmożonej gotowości obronnej na atak patogenów, po przebytych umiarkowanym stresie abiotycznym, wykorzystałam układ doświadczalny metal-roślina-patogen w postaci glin-ziemniak-*Phytophthora infestans*.

W efekcie przeprowadzonych ostatnio eksperymentów wykazałam, że przebycie przez roślinę umiarkowanego stresu glinowego stosowanego na poziomie korzeni prowadzi do uruchomienia w liściach skutecznych odpowiedzi obronnych skorelowanych z redukcją symptomów chorobowych wywołanych przez *P. infestans* (Arasimowicz-Jelonek i in. 2013). Stanowi podwyższonej gotowości obronnej liści, w następstwie ekspozycji korzeni na glin, towarzyszyła akumulacja NO, co wykazałam dzięki zastosowaniu nowego, wysoce specyficznego fluorochromu Cu-FL. Najistotniejsze jednak zmiany obejmowały „przekazywanie informacji” od NO w postaci wzmożonego formowania S-nitrozotoli, głównie w wiązkach przewodzących liści oraz w pędzie ziemniaka. Indukowane glinem dystalne generowanie NO korelowało ponadto z ekspresją PR-2 oraz PR-3 zarówno na poziomie mRNA, jak i aktywności enzymatycznej. Co ciekawe, kluczowy marker odporności na stres biotyczny tj. *PR-1*, którego indukcji nie obserwowano w odpowiedzi na glin, ulegał zdecydowanie szybszej i blisko 30-krotnie wyższej ekspresji w następstwie inokulacji, w porównaniu do liści nietraktowanych glinem, a inokulowanych patogenem. Można zatem stwierdzić, iż w efekcie umiarkowanego stresu glinowego roślina reaguje szybciej i efektywniej na stres wtórny wywołany patogenem.

W podsumowaniu stwierdzam, iż najważniejsze wyniki badań, w których brałam udział, to w moim odczuciu: **(1) wykazanie udziału NO w procesie regeneracji uszkodzeń mechanicznych liści poprzez wzmożoną i związaną z NO lignifikacją i akumulacją kalozy w miejscu zablizniania tkanki, (2) wykazanie zależnej od poliamin produkcji NO podczas stresu odwodnienia oraz udziału NO w inicjowaniu skutecznych mechanizmów adaptacyjnych korzeni podczas procesu przedłużającego się odwodnienia tkanki, (3) wykazanie obecności nadtlenoazotynu (ONOO^-) jako efektu zmiatania przez NO anionorodnika ponadtlenkowego podczas łagodnego stresu kadmowego w korzeniach łubinu (4) wykazanie udziału NO w indukcji PCD komórek korzeni eksponowanych na kadm, co w konsekwencji generuje systemiczne zmiany przystosowawcze w liściach, (5) wykazanie potencjalnej roli NO, poprzez S-nitrozylację białek, w nabywaniu odporności krzyżowej ziemniaka na stres biotyczny.**

Literatura

- Alamillo J.M., Garcia-Olmedo F. 2001. Effects of urate, a natural inhibitor of peroxynitrite-mediated toxicity, in the response of *Arabidopsis thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant J.* 25, 529–540.
- Arasimowicz M.**, Floryszak-Wieczorek J. 2007. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. *Plant Sci.* 172, 876-887.
- Arasimowicz M.**, Floryszak-Wieczorek J., Milczarek G., Jelonek T. 2009. Nitric oxide, induced by wounding, mediates redox regulation in pelargonium leaves. *Plant Biol.* 11, 650-663.
- Arasimowicz-Jelonek M.**, Floryszak-Wieczorek J., Kubiś J. 2009a. Interaction between polyamine and nitric oxide signaling in adaptive responses to drought in cucumber. *J. Plant Growth Regul.* 28, 177–186.
- Arasimowicz-Jelonek M.**, Floryszak-Wieczorek J., Kubiś J. 2009b. Involvement of nitric oxide in water stress-induced responses of cucumber roots. *Plant Sci.* 177, 682-690.
- Arasimowicz-Jelonek M.**, Floryszak-Wieczorek J. 2011. Understanding the fate of peroxynitrite in plant cells - from physiology to pathophysiology. *Phytochemistry* 72, 681-688.
- Arasimowicz-Jelonek M.**, Floryszak-Wieczorek J., Gwóźdź E.A. 2011. The message of nitric oxide in cadmium challenged plants. *Plant Sci.* 181, 612-620.
- Arasimowicz-Jelonek M.**, Floryszak-Wieczorek J., Deckert J., Rucińska-Sobkowiak R., Gzyl J., Pawlak-Sprada S., Abramowski D., Jelonek T., Gwóźdź E.A. 2012. Nitric oxide implication in cadmium induced programmed cell death in roots and signaling response of yellow lupine plants. *Plant Physiol. Biochem.* 58, 124-134.
- Arasimowicz-Jelonek M.**, Floryszak-Wieczorek J., Drzewiecka K., Chmielowska-Bąk J., Abramowski D., Izbiańska K. 2013. Aluminum induces cross-resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Planta* DOI: 10.1007/s00425-013-2008-8
- Arasimowicz-Jelonek M.**, Floryszak-Wieczorek J. 2013. Nitric oxide: an effective weapon of the plant or the pathogen? *Mol. Plant Pathol.* DOI: 10.1111/mpp.12095
- Creelman R.A., Mullet J.E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 355–381.
- Chester K. 1933. The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quart. Rev. Biol.* 8, 129–151.

- Corpas F.J., Hayashi M., Mano S., Nishimura M., Barroso J.B. 2009. Peroxisomes are required for in vivo nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.* 151, 2083–2094.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585–588.
- Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13454-13459.
- Durner, J., Wendenhenne, D., Klessig, D.F., 1998. Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10328–10333.
- Floryszak-Wieczorek J., Milczarek G., **Arasimowicz M.**, Ciszewski A. 2006. Do nitric oxide donors mimic an endogenous NO-related response in plants? *Planta* 224, 1363-1372.
- Floryszak-Wieczorek J., **Arasimowicz M.**, Milczarek G., Jeleń H., Jackowiak H. 2007. Only an early nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defence responses of pelargonium to a necrotrophic pathogen. *New Phytol.* 175, 718-730.
- Lutts S., Majerus V., Kinet J.M. 1999. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiol. Plant.* 105, 450–458.
- Overmyer K., Brosché M., Kangasjärvi J. 2003. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci.* 8, 335-342.
- Poschenrieder C., Tolra R., Barcelo J. 2006. Can metals defend plants against biotic stress? *Trends Plant Sci.* 11, 288-295.
- Saito S., Yamamoto-Katou A., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K. 2006. Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 47, 689 – 697.
- Walters D.R. 2009. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. *Crop Prot.* 28, 459-465.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Prezentacje ustne wygłoszone podczas krajowych i międzynarodowych konferencji naukowych

- wygłoszenie referatów na zaproszenie organizatorów

1. **Arasimowicz-Jelonek, M.**, Floryszak-Wieczorek, J., Rucińska-Sobkowiak R., Gwóźdź, E. A. 2010. Nitric oxide and NADPH-oxidase dependent oxidative burst is required for cadmium-induced programmed cell death in lupine roots. The 3rd International Plant NO Club conference, 15-16 July 2010, Olomouc, Czech Republic
2. **Arasimowicz-Jelonek M.**, Pawlak-Sprada S., Floryszak-Wieczorek J., Deckert J., Gwóźdź E.A. 2010. The effect of cadmium on endogenous nitric oxide generation in primary leaves of lupine. Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, 20-23 wrzesień 2010, Wisła, Polska
3. **Arasimowicz-Jelonek M.**, Floryszak-Wieczorek J., Deckert J., Pawlak-Sprada S., Rucińska-Sobkowiak R., Gzyl J., Abramowski D., Gwóźdź E.A. 2011. Nitric oxide contributes to distal signal generation from roots to leaves in Cd-challenged seedlings of yellow lupine. 5th Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology, September 6-9, 2011, Wrocław, Polska

- wygłoszenie pozostałych referatów

1. **Arasimowicz M.**, Floryszak-Wieczorek J., Milczarek G., 2007. The role of nitric oxide (NO) in the resistance of pelargonium leaves to *Botrytis cinerea*. 7th International Conference Eco-physiological aspects of plant responses to stress factors, 19-22 september, Cracow 2007; *Acta Physiol Plant* (2007) 29 (Suppl 1):S13
2. Pawlak S., **Arasimowicz-Jelonek M.**, Mulcan A., Deckert J. 2009. Aktywacja szlaku fenylopropanoidów w korzeniach roślin motylkowatych traktowanych metalami ciężkimi. I Warsztaty Naukowe Instytutu Biologii Eksperymentalnej. UAM, Poznań 20.06.2009, Polska
3. **Arasimowicz-Jelonek M.**, Floryszak-Wieczorek J., Pawlak-Sprada S. Deckert J., Rucińska-Sobkowiak R., Gzyl J., Gwóźdź E.A. 2011. The implication of nitric oxide in cadmium-induced programmed cell death in lupine roots. II Konferencja Wydziału Biologii UAM - Challenges for Contemporary Biology, Biotechnology and Environmental Protection. 5-7 kwiecień 2011, Polska

Stypendia i staże zagraniczne

1. Pobyt naukowo-badawczy oraz zaproszenie do wygłoszenia referatu na zebraniu naukowym w Instytucie Biologii Eksperymentalnej (**Brno, Czechy**, Department of Experimental Biology, Masaryk University) na temat „The role of nitric oxide (NO) in the plant resistance to necrotrophic patogen” – maj 2010;
2. Stypendium wyjazdowe w ramach programu FSS "Mobilność Studentów i Pracowników" - udział w warsztatach na temat odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe oraz zaproszenie do wygłoszenia referatu na zebraniu naukowym na temat „Nitric oxide and environmental stresses” (**Norwegia, Trondheim**, Norwegian University of Science and Technology, Department of Biology, Plant Cell and Molecular Biology Group) – maj 2011;
3. Grant Wallonia-Brussels International (WBI) na badania prowadzone we współpracy z The Catholic University of Leuven (**Louvain-la-Neuve, Belgia**) oraz zaproszenie do wygłoszenia referatu na zebraniu naukowym na temat „Nitric oxide signaling in plant response to stress” – 27 sierpień - 26 wrzesień 2012.

Udział w badaniach naukowych i grantach krajowych

Kierownik projektów

1. Projekt finansowany przez MNiSW N N310 040839 (2010 – 2013) - „Indukowana jonami glinu tolerancja krzyżowa ziemniaka względem *P. infestans*” (projekt własny)
2. Projekt finansowany przez MNiSW „IUVENTUS PLUS” IP2010 000770 (2010-2011) – “Homocysteina jako potencjalny biomarker stanu patofizjologicznego w roślinie - w układzie modelowym ziemniak / *Phytophthora infestans*”
3. Projekt finansowany przez MNiSW „IUVENTUS PLUS” IP2011 000671 (2012-2014) – „Kontynuacja badań nad poszukiwaniem biomarkerów stanu patofizjologicznego w roślinie - w układzie modelowym ziemniak / *Phytophthora infestans*”

Wykonawca w projektach:

1. Projekt finansowany przez KBN 2P06A 01627 (2005-2007) – (Kierownik: Prof. dr hab. J. Floryszak-Wieczorek) – „Rola indukowanej śmierci komórki w nabywaniu wzmożonej gotowości obronnej przez roślinę”;
2. Projekt finansowany przez KBN 2P06A 03329 (2005-2006) - (Kierownik: Prof. dr hab. J. Floryszak-Wieczorek) – „Wpływ tlenu azotu na system antyoksydacyjny rośliny w odpowiedzi na nekrotroficzny patogen” - grant promotorski;
3. Projekt finansowany przez MNiSW N303 303634 (2007-2010, UAM; Kierownik: Prof. zw. dr hab. E.A. Gwóźdź) – „Rola tlenu azotu (NO) w indukowanej kadmem śmierci komórek korzeni roślin uprawnych”
4. Projekt finansowany przez MNiSW NN303 340735 (2008-2011, UP; Kierownik: Prof. dr hab. J. Floryszak-Wieczorek) – „Udział tlenu azotu (NO) w mechanizmie stresowego zapisu molekularnego w roślinie - w układzie modelowym ziemniak / *Phytophthora infestans*”;
5. Projekt finansowany przez MNiSW N N309 007437 (2009-2013, UAM; Kierownik: dr A. Bagniewska-Zadworna) – „Biologia, anatomia funkcjonalna oraz ksylogeneza korzeni chłonnnych i pionierskich topoli”;
6. Projekt finansowany przez MNiSW N N303 801940 (2010-2013, UAM; Kierownik dr M. Krzesłowska) – „Modyfikacje budowy ściany komórkowej w odpowiedzi na ołów oraz przyczyny ich powstawania”.
7. Projekt finansowany przez NCN 2011/01/B/NZ9/00243 (2011-2014, UP; Kierownik prof. dr hab. J. Floryszak-Wieczorek) - „Poszukiwanie nowych źródeł syntezy i funkcjonowania tlenu azotu wodporności liści ziemniaka na *Phytophthora infestans*”.

Nagrody i wyróżnienia za działalność naukowo-badawczą

2007 - Wyróżnienie w konkursie o Nagrodę Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin i Carl Zeiss Sp. z o.o. na najlepszą pracę naukową w zakresie biologii eksperymentalnej roślin opublikowaną w latach 2005-2006:

- Floryszak-Wieczorek J., Milczarek G., **Arasimowicz M.**, Ciszewski A., 2006. Do nitric oxide donors mimic an endogenous NO-related response in plants? *Planta* 224: 1363-1372 - praca znalazła się na siódmym miejscu;
- 2007** - Pierwsze miejsce decyzją Międzynarodowego Jury oraz niezależnie Pierwsza Nagroda Auditorium za prezentację ustną w konkursie "Young Scientists Competition" podczas: 7th International Conference Ecophysiological Aspects of Plant Responses to Stress Factors, 19-22 September 2007, Kraków (**Arasimowicz M.**, Floryszak-Wieczorek J., Milczarek G., The role of nitric oxide (NO) in the resistance of pelargonium leaves to *Botrytis cinerea*. *Acta Physiologia Plantarum* 2007, 29; Suppl 1:S13);
- 2007** - Zajęcie pierwszego miejsca w rankingu czasopisma *Plant Science* „Top 25 hottest articles” w okresie VI-IX 2007, drugiego w okresie X-XII 2007 oraz dziesiątego w okresie I-III 2008 za pracę: „Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses.” (**Arasimowicz M.**, Floryszak-Wieczorek J., 2007. *Plant Science* 172: 876-887);
- 2009** - Wyróżnienie w konkursie o Nagrodę Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin i Carl Zeiss Sp. z o.o. na najlepszą pracę naukową w zakresie biologii eksperymentalnej roślin opublikowaną w latach 2007-2008: Floryszak-Wieczorek J., **Arasimowicz M.**, Milczarek G., Jeleń H., Jackowiak H., 2007. Only an early NO burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defense responses of pelargonium to necrotrophic pathogen. *New Phytologist* 175: 718-730 - praca znalazła się na trzecim miejscu;
- 2009** - Drugie miejsce decyzją Auditorium za prezentację posterową w konkursie "Young Scientists Competition" podczas: 8th International Conference Ecophysiological Aspects of Plant Responses to Stress Factors, 16-19 September 2009, Kraków (**Arasimowicz-Jelonek M.**, Floryszak-Wieczorek J., Kubiś J.: Interaction between polyamine and nitric oxide signaling in adaptive responses to drought in cucumber. *Book of Abstracts*: s35);
- 2010** - Indywidualna Nagroda Rektora UAM III stopnia za osiągnięcia naukowe w roku 2009.

- 2011** oraz **2012** - Zajęcie II miejsca w rankingu czasopisma Plant Science Top 10 Cited (Extracted from Scopus) przez pracę: „Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses.” (**Arasimowicz M.**, Floryszak-Wieczorek J. 2007. Plant Science 172: 876-887);
- 2012** - Zespołowa Nagroda Rektora UAM II stopnia za osiągnięcia naukowe w roku 2011;
- 2013** - Wyróżnienie w konkursie o Nagrodę Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin na najlepszą pracę eksperymentalną opublikowaną w latach 20011-2012: Floryszak-Wieczorek J., **Arasimowicz-Jelonek M.**, Milczarek G., Janus Ł., Pawlak-Sprada S., Abramowski D., Deckert J., Billert H. 2012. Nitric oxide-mediated stress imprint in potato as an effect of exposure to a priming agent. Molecular Plant Microbe Interaction, 25, 1469 – 1477 - praca znalazła się na ósmym miejscu;
- 2013** - Zespołowa Nagroda Rektora UAM III stopnia za osiągnięcia naukowe w roku 2012;
- 2013 – 2016** - Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców.

Magdalena Arasimowicz-Jelonek
Poznań, 13.12.2013